Instruções de utilização de Biofortuna SSPGo™ HLA Typing Kits

CE Revisão 5, janeiro de 2014

1. Finalidade de uso

Os kits Biofortuna HLA SSPGo são kits qualitativos à base de ADN para a determinação de alelos do HLA em kits de "baixa resolução" ou para a amplificação grupo-específica de alelos em kits de resolução de "nível intermédio/médio". A resolução de nível médio é normalmente definida como a resolução em que a maioria dos resultados é claramente definida ao nível dos dois dígitos; p. ex. DQB1*02, DQB1*05, etc. A elevada resolução é geralmente definida como a maioria dos alelos ao nível do quarto dígito tais como DQB1*02:01, DQB1*05:01, etc. Este produto destina-se a ser utilizado em diagnóstico *in vitro* apenas por pessoal devidamente treinado para o efeito.

2. Introdução

As moléculas do HLA desempenham um papel fundamental na imunidade e no reconhecimento do próprio versus não-próprio, consequentemente a genotipagem do HLA e a determinação da compatibilidade do HLA é obrigatória antes da maior parte dos tipos de transplantes. Como os antigénios HLA restringem a especificidade das respostas imunitárias mediadas pelas células-T, a genotipagem do HLA é uma ferramenta útil na investigação de doenças imunitárias e de respostas imunitárias a patogéneos, vacinas ou tratamento clínico. A genotipagem do HLA também pode ser utilizada como meio auxiliar no diagnóstico de doenças em que tenha sido demonstrada uma ligação significativa de determinados alelos do HLA à doença.

A maior parte dos genes do HLA é altamente polimórfico e geralmente é necessária a genotipagem do ADN para a determinação exata dos antigénios do HLA. A genotipagem por PCR utilizando primers específicos de sequências (SSP - Sequence-Specific Primers)[1] é um método rápido de genotipagem do HLA, particularmente adequado para situações em que é necessária uma resolução de nível médio. Todos os kits Biofortuna SSP incluem reações secas completas, incluindo polimerase, o que significa que a única coisa que o utilizador precisa de fazer antes da PCR é adicionar ADN.

São feitos todos os esforços para manter estes kits atualizados com os dados de alinhamento do HLA disponibilizados pelo IMGT. As atualizações dos kits estão disponíveis em www.biofortuna.com.

3. Descrição do teste

A técnica PCR SSP baseia-se no princípio de que só serão amplificados os primers com terminais 3' totalmente compatíveis com uma sequência alvo. Os primers não compatíveis não originam produtos de amplificação positivos[2]. Em todas as misturas de reação PCR está incluído um par de primers de controlo interno, que amplifica uma região

conservada de um gene housekeeping; o par de primers de controlo interno é um indicador da integridade da reação PCR. A genotipagem SSP utiliza geralmente reações múltiplas que, quando analisadas em conjunto, indicam o genótipo. A visualização dos produtos amplificados pode ser conseguida utilizando sistemas de eletroforese em gel de agarose que separam os fragmentos de ADN por tamanho.

4. Conteúdo do kit

- Placas ou tiras de polipropileno para PCR com 8 - 96 poços de PCR (dependendo do kit), cada poço contém primers, polimerase, dNTPs* e tampão liofilizados, pré-dispensados. Cada placa ou tira é fornecida selada com uma folha ou tampa e embalada individualmente dentro de uma bolsa de alumínio contendo uma bolsa de dessecante.
- Tampas ou folhas selantes para PCR
- 1x Instruções de utilização.
- Certificado de análise
- As tabelas de interpretação e fichas de segurança dos materiais estão disponíveis no sítio da Biofortuna www.biofortuna.com. Se tiver problemas em aceder a estes documentos, por favor contactar o seu distribuidor local.

*Trilink Biotechnologies Inc licenciou a utilização de CleanAmp™ dNTPs com os produtos Biofortuna SSPGo.

5. Reagentes e equipamentos não fornecidos

- Pipetas e pontas de pipetas estéreis calibradas apropriadas, p. ex. pipeta P10 com pontas com filtro de 10 µl.
- Kit/equipamento de isolamento de ADN.
- Espectrofotómetro de UV.
- Tubos de polipropileno.
- Água esterilizada para utilização em biologia molecular.
- Deve ser utilizado um termociclador com as seguintes especificações:
  - Termociclador de 96 poços com tampa aquecida com uma temperatura de 104°C para funcionamento sem óleo
  - Taxa de rampa de 1,0°C/seg.
  - Gama de temperatura de 4,0°C a 99,9°C
  - Precisão da temperatura de ±0,25°C para a gama de 35°C a 99,9°C
  - Calibração da temperatura rastreável a uma norma de referência
  - Programar o termociclador usando os parâmetros de ciclo PCR da secção 8 em baixo.

  Nota: Para informações específicas do termociclador consultar o manual de utilização do fabricante. O termociclador deve ser calibrado de acordo com as regras de acreditação da ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics) ou da EFI (European Federation of Immunogenetics).

- Reagentes de eletroforese em gel (agarose, TBE 0,5x, marcador de peso molecular de ADN de 1000 pb, 10 mg/ml de brometo de etídio).
- Equipamento de eletroforese em gel (tinas de gel, fonte de alimentação, sistema de documentação do gel com transiluminador de UV).
- Software para auxiliar na análise manual dos resultados dos testes kit SSPGo eo armazenamento de dados de arquivo pode ser baixado do site da Biofortuna www.biofortuna.com.

  Nota: quaisquer alterações nas condições especificadas, tais como taxas de rampa do termociclador, podem afetar a interpretação dos resultados do teste.

6. Avisos e segurança

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Os testes só devem ser realizados por pessoal devidamente treinado para o efeito.
- Todos os resultados de tipagem devem ser verificados por pessoal qualificado e, se forem utilizados na tomada de decisões clínicas, os resultados devem ser confirmados utilizando outro método de tipagem.
- Todos os reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Manter as zonas de pré e pós-PCR separadas. Os materiais da zona pós-PCR não podem ser levados para a zona de pré-PCR.
- **Aviso de perigo biológico:** manusear todos os produtos sanguíneos como potencialmente infeciosos.
- **Aviso de perigo biológico:** o brometo de etídio é um potencial carcinogéneo. Se for utilizado, devem utilizar-se sempre luvas, bata de laboratório e proteção ocular.
- **Aviso de perigo biológico:** tomar as devidas precauções ao utilizar fontes de luz UV - utilizar sempre luvas, bata de laboratório e proteção ocular. Nunca olhar diretamente para a fonte de luz UV.
- As fichas de segurança dos materiais estão disponíveis em www.biofortuna.com.

7. Conservação e estabilidade

Os kits Biofortuna SSPGo devem ser conservados entre 2 a 28°C. Depois das cuvetes PCR serem retiradas das bolsas de alumínio os reagentes devem ser reidratados com ADN no prazo de 3 horas. Consultar o prazo de validade na embalagem. Não utilizar os produtos após a data impressa.

Se a bolsa de alumínio estiver rasgada ou perfurada ou se não existir uma bolsa de dessecante, não utilizar os kits.

Usando somente as tampas ou folhas selantes fornecidas, assegurar que as cuvetes para PCR estão bem seladas após a adição do ADN, uma vez que se não o estiverem se pode verificar evaporação durante a amplificação PCR. Tomar especial atenção às extremidades e aos cantos.

Nota (1): Se necessário, as placas e as tiras de PCR não hidratadas e fora da bolsa podem ser mantidas durante até 3 horas antes da adição de ADN a uma temperatura de até 21°C e uma humidade não superior a 60%.

Nota (2): Uma vez hidratadas com ADN, as tiras e placas de PCR de bolsas recém abertas podem ser armazenadas durante até 24 horas a 2 a 8°C antes do passo de PCR, desde que os poços estejam bem selados para evitar evaporação.

8. Instruções de utilização

Requisitos da amostra de ADN

Cada reação no teste está otimizada para utilizar entre 50 - 100 ng de ADN, mas é muito importante que cada reação seja reidratada com exatamente 10 µl de líquido. Portanto, o teste pode ser efetuado com 10µl de ADN a 5-10ng/µl. Diluir o ADN na concentração requerida somente em água esterilizada para utilização em biologia molecular.

Atenção: Assegurar que a amostra final de ADN não contém mais de 2,5mM Tris/0,25mM EDTA. Usar somente ADN extraído de amostras recolhidas de citrato e EDTA. Como a heparina pode inibir a PCR, recomenda-se que o ADN não seja extraído de amostras de sangue heparinizadas. Demonstrou-se que a hemoglobina interfere com kits SSPGo HLA quando presente em amostras de ADN superiores a 1 mg/dL.

O ADN pode ser extraído usando todos os métodos tradicionais de extração. Assegurar que a $DO_{260/280}$ da amostra de ADN medida através de espectrofotometria de UV se situa entre 1,66 e 1,94.

Instruções pré-PCR

i. Retirar uma placa ou tira SSPGo de uma bolsa selada.

ii. Anotar o número de lote do produto do ensaio.
iii. Assegurar que todas as pastilhas liofilizadas (reagentes de PCR) estão no fundo dos poços dos tubos/placa antes de remover o selante ou a tampa. Caso contrário, bater levemente para que a pastilha se desloque para o fundo do tubo.

A primeira reação de cada locus de teste é sempre de cor rosa claro relativamente ao resto do kit. (Vermelho quando hidratado). Algumas placas de PCR contêm uma reação "no template control" (controlo negativo) integral de cor púrpura no último poço da placa.

iv. Utilizando equipamento esterilizado pipetar 10 µl de solução de ADN para cada reação da placa ou tira. Consultar a nota na secção 8, Requisitos da amostra de ADN. Se a placa tiver o "no template control" integral de cor púrpura, pipetar para o mesmo 10 µl de diluente da amostra (sem ADN). Consultar a nota sobre "No Template Control" na secção 8.
v. Assegurar que o ADN entra em contacto com os reagentes secos em cada reação antes de se submeterem ao termociclador.
vi. Selar as reações com uma folha selante ou tampas para tubos PCR fornecidas. Assegurar que o selante está bem colocado para evitar evaporação. Tomar especial atenção às extremidades e aos cantos.
vii. Colocar a placa ou as tiras diretamente no termociclador. Assegurar que as cuvetes estão completamente inseridas no bloco e que a tampa está totalmente comprimida. Caso contrário, pode verificar-se a falha individual da PCR devido a evaporação e condensação da PCR.
viii. Efetue o programa PCR (consultar Parâmetros PCR*)*.

NOTA SOBRE RESSUSPENSÃO: Logo que os poços de PCR sejam retirados das bolsas de alumínio, os reagentes deverão ser imediatamente reidratados com ADN. Ver a Nota (1) e a Nota (2) para obter informações adicionais.

NOTA SOBRE O "NO TEMPLATE CONTROL": alguns kits incluem um "No Template Control" (NTC) como reação final na placa. Esta reação contém um corante púrpura para a distinguir do resto das reações. O NTC está concebido para detetar contaminação PCR ou contaminação de ADN genómico que pode estar presente na água utilizada para ressuspender o ADN. Se houver contaminação PCR serão observados produtos amplificados de tamanho variável .

NOTA SOBRE O PERFIL DE ALTURA DA PLACA/TIRA PCR: recomenda-se que o perfil de altura das placas e tiras seja equivalente quando estas são colocadas no mesmo aparelho PCR. Perfis de altura diferentes podem originar mau contacto com a tampa aquecida dos aparelhos PCR. Isto pode dar origem a uma amplificação PCR falhada ou fraca.

Parâmetros PCR

Devem ser utilizados os seguintes parâmetros PCR. Assegurar velocidades de rampa de 1°C por segundo, e ativar a tampa aquecida. Para obter instruções de utilização completas, consultar o manual de utilização do fabricante do termociclador. Os termocicladores devem ser calibrados de acordo com as regras de acreditação da American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) ou da European Federation of Immunogenetics (EFI).

Desnaturar	94°C	5 minutos	
Desnaturar	96°C	15 segundos	
Hibridar	66°C	50 segundos	10 ciclos
Extensão	72°C	30 segundos	
Desnaturar	96°C	15 segundos	
Hibridar	64°C	50 segundos	20 ciclos
Extensão	72°C	30 segundos	

HOLD a 15°C durante um período não superior a 72 horas antes de colocar o gel. Se necessário, a placa de PCR pode ser armazenada a 2 - 8 °C durante até 24 horas antes de colocar o gel. Assegurar sempre que as placas estão bem seladas.

Eletroforese em gel

Estas instruções aplicam-se à eletroforese horizontal em gel de agarose: preparar um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5x. Quando o gel tiver arrefecido e tiver atingido uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar brometo de etídio para obter uma concentração final de 0,5 µg/ml. Moldar o gel e inserir pentes de formato de microtitulação (p. ex. 12x8 poços com espaçamento de 9 mm). Quando o gel estiver consistente, retirar os pentes e cobrir o gel em tampão TBE 0,5x. Carregar todo o produto PCR em sequência no gel de agarose a 2%, anotando a posição de cada reação. Recomenda-se uma escala de 1000 pb para ajudar a determinar o tamanho. Submeter o gel a 10 V/cm durante 20 minutos.

Para obter informações detalhadas sobre o equipamento, consultar as instruções de utilização do fabricante do sistema de eletroforese. Os géis devem ser visualizados utilizando um sistema de documentação de gel UV com um transiluminador de UV.

Nota: Eletroforese insuficiente pode conduzir a produtos amplificados de grande dimensão, superior a 600 bp, que se fundem com produtos amplificados de controlo. Assegurar que a eletroforese é suficiente para visualizar esses produtos amplificados. Uma eletroforese demasiado prolongada pode provocar a perda de produtos amplificados de pequena dimensão nos poços de gel anteriores.

9. Interpretação

Os kits SSPGo são concebidos para que os resultados possam ser determinados manualmente utilizando tabelas de interpretação disponíveis em www.biofortuna.com. Se tiver problemas em aceder ao sítio da Internet, por favor contactar o seu distribuidor local.

As tabelas de interpretação podem incluir notas específicas dos lotes que podem ser relevantes para a interpretação.

Afixar a fotografia do gel ao formulário de interpretação correspondente, fazendo corresponder os números do kit e do lote. Examinar a imagem do gel. Cada reação deve conter uma banda de controlo positivo. Consultar as tabelas de interpretação já que esta pode ter um tamanho diferente em diferentes produtos SSPGo. As bandas de controlo interno podem aparecer muito mais fracas quando estão presentes bandas específicas de alelos. Se estiver presente uma banda específica de um alelo, mas não uma banda de controlo, o resultado deve, ainda assim, ser considerado positivo. Bandas inferiores a 70 pb devem ser ignoradas porque são primers não incorporados.

Determinar as reações positivas. As reações positivas são indicadas por bandas do tamanho esperado, tal como indicado nas tabelas de interpretação. Ter em atenção que pode haver mais de um tamanho de produto numa dada reação – estas são reações multiplex e estão assinaladas nas tabelas de interpretação.

Comparar as reações positivas com as tabelas de interpretação. Um resultado positivo numa reação indica a presença de pelo menos um dos alelos indicados na tabela de interpretação. Um determinado alelo pode ser amplificado em vários tubos – se o alelo estiver presente deverá ocorrer uma reação positiva em todas as reações relevantes.

Fig. 1 Exemplos de reações positivas, indicadas pela presença de bandas específicas de alelos e bandas de controlo (reações 1-3); reações negativas, indicadas pela presença de bandas de controlo mas ausência de bandas específicas de alelos (reações 4-7); e uma reação falhada, indicada pela ausência de quaisquer bandas (reação 8).

Assegurar que o número de lote do kit corresponde ao número de lote na tabela de interpretação.

Software para auxiliar na análise manual dos resultados dos testes kit SSPGo eo armazenamento de dados de arquivo pode ser baixado do site da Biofortuna www.biofortuna.com.

10. Garantia e controlo de qualidade

Todos os lotes de SSPGo são submetidos a uma verificação de qualidade antes da sua introdução no mercado. As amostras de cada lote de kits são verificadas com base num painel de amostras de ADN humano para assegurar um desempenho correto. Cada reação foi validada com base em, pelo menos, 47 amostras de linhas celulares de ADN bem caracterizadas. A Biofortuna recomenda que qualquer laboratório valide internamente quaisquer novos produtos de tipagem antes da sua utilização em amostras clínicas. A tipagem para efeitos de diagnóstico só deve ser realizada por pessoal qualificado e treinado e os resultados devem ser confirmados por outro elemento treinado do pessoal.

11. Dados clínicos

Um estudo de dispositivo de diagnóstico in vitro foi realizado em cinco centro de teste comparando o desempenho de SSPGo HLA Typing Kits ao dispositivo indicado, "One Lambda" Labtype SSO. A tipagem de locus realizada para o ensaio SSPGo forneceu resultados de teste para HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1/3/4/5, HLA-DPB1, DPA1 e HLA-DQA1*05, DQB1*02, DQ8.

O desempenho clínico dos SSPGo HLA Typing Kits forneceu uma concordância global de 98,3 - 100% em relação ao dispositivo indicado (método SSO) com uma confiança não inferior a 95% para a genotipagem de alelos da classe I e II HLA testado de ADN derivado de sangue total a 5-10ng/µl.

Excluindo três (3) resultados de genotipagem não confirmados, foi alcançada uma concordância de 100% para 1.222 amostras de 3 lotes de cada kit de teste nos centros de teste clínico nos EUA e no Reino Unido.

A reprodutibilidade centro a centro dos SSPGo HLA Typing kits foi realizada por três centros usando um painel representativo de 8 reações SSPGo PCR face às amostras de ADN fornecidas formuladas a 4ng/µl e 11ng/µl, os extremos da gama de concentração do kit de teste. Um total de 958/960 reações individuais distribuídas igualmente por três centros externos foram concordantes com as amostras de ADN resultando numa concordância global de 99,7% (0,995 LCL).

A reprodutibilidade lote a lote foi realizada em três lotes de um kit de teste SSPGo HLA representativo por um único centro/operador usando a gama de concentração de ADN de 5-10 ng/µL. A reprodutibilidade lote a lote do teste SSPGo HLA Type foi 100% concordante e, relação ao dispositivo indicado para 130/130 amostras de ADN testadas em três (3) lotes de testes SSPGo HLA Type representativos de um total de 390 testes.

A verificação SSPGo HLA positiva concordante foi obtida para alelos da classe I e da classe II em testes comparativos com amostras clínicas LABType SSO testadas. Testes internos de SSPGo HLA forneceram resultados concordantes em relação a amostras de ADN de referência, exceto para amostras não disponíveis, tais como determinados alelos HLA-DPB1 raros e alelos HLA-B raros e grupos de alelos, tais como B*59:01, B*78 e B*83:01. Os seguintes grupos de alelos raros não foram confirmados. –

B*59, B*78, B*83, DPB*21:01, DPB*26:01:02, DPB*27:01, DPB*28:01, DPB*29:01, DPB*31:01, DPB*34:01, DPB*35:01:01, DPB*39:01, DPB*45:1, DPB*46:01, DPB*51:01, DPB*55:01, DPB*59:01, DPB*63:01, DPB*81:01, DPB*85:01 e DPB*105:01

12. Referências

1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

13. Guia de resolução de problemas SSPGo

Problema	Causa provável	Solução
Ausência de amplificação nas reações	Foi utilizada uma concentração incorreta de ADN	Medir a quantidade de ADN medindo a OD_{280} e assegurar que no total são adicionados 50 - 100 ng de ADN a um volume de 10 µl, por reação.
	Inibidores da PCR presentes na amostra de ADN	Não usar sangue heparinizado, evitar amostras de ADN que contenham mais de 1 mg/dL de hemoglobina.
	Foi utilizada uma amostra de ADN de fraca qualidade	Medir a qualidade do ADN. O rácio$OD_{260/280}$ deve ser de 1,66 – 1,94 através de espectrofotometria de UV. Assegurar que o ADN está totalmente ressuspenso na solução antes de utilizar. Assegurar que a amostra de ADN foi diluída em água para utilização em biologia molecular e não contém mais de 2,5mM Tris/0,25mM EDTA
	Os reagentes não estão totalmente ressuspensos	Assegurar que as pastilhas ficam totalmente reidratadas quando se adiciona o ADN. Assegurar que são utilizados 10µl de solução de ADN por reação.
	O termociclador não foi devidamente configurado	Assegurar que o programa PCR foi introduzido corretamente, de acordo com as instruções de utilização. Assegurar que a tampa aquecida do termociclador está ativada e que está suficientemente apertada. Para mais informações consultar as instruções de utilização do termociclador.
	Problemas com a eletroforese	Assegurar que a tina de eletroforese tem energia elétrica – verificar a fonte de alimentação e limpar os elétrodos. Colocar o gel em tampão TBE 0,5X. Assegurar que são utilizados 0,5 µg/ml de brometo de etídio fresco. Ao visualizar o gel, assegurar que a iluminação UV é suficiente. Para mais informações consultar as instruções de utilização fornecidas pelo fabricante da tina de gel e da fonte de alimentação.
	As placas não foram devidamente seladas.	Placas seladas incorretamente podem dar origem a evaporação durante a PCR. A Biofortuna fornece folhas

Problema	Causa provável	Solução
		de selagem recomendadas no kit. Para outros fornecimentos, contactar o seu distribuidor Assegurar que todos os poços estão devidamente selados. Tomar especial atenção aos poços situados próximo das extremidades da placa ou tira de PCR.
Saídas aleatórias de controlo e/ou produtos amplificados específicos de alelos.	Erros no gel	Assegurar que todos os poços foram colocados no gel pela ordem correta e que foi adicionado a cada um o mesmo volume de reação de PCR. Calibrar as pipetas conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante. Verificar se os poços estão devidamente formados no gel. Remover os pentes com cuidado para não rasgar o fundo dos poços. Assegurar que a agarose está totalmente dissolvida antes de moldar o gel. Assegurar que o gel não é submetido à corrente elétrica durante demasiado tempo, já que os produtos amplificados de menor dimensão podem sair pela extremidade. Assegurar que o gel é submetido à corrente elétrica durante tempo suficiente para permitir que as bandas se separem. Utilizar solução de brometo de etídio nova.
	Problemas com o termociclador	Falhas, em particular em redor da extremidade do ensaio, podem dever-se ao facto de a tampa não estar suficientemente apertada. Isto pode dar origem a evaporação e a condensação da reação PCR a meio do poço PCR e pode originar falha da PCR. Seguir as instruções de manutenção e de calibração do fabricante do termociclador. Verificar se os parâmetros PCR estão corretos, de acordo com as instruções de utilização.
	Problemas de evaporação	Assegurar que todos os poços estão devidamente selados. Tomar especial atenção aos poços situados próximo das extremidades da placa ou das tiras de PCR. Assegurar que a tampa aquecida está ativada e é aplicada compressão suficiente através da tampa.

Problema	Causa provável	Solução
		Assegurar que as folhas de selagem Biofortuna (fornecidas) são usadas. Para outros fornecimentos, contactar o seu distribuidor)
	Falha esporádica devido a problemas de ADN	Sem ADN presente: assegurar que todos os poços têm ADN. Volume incorreto: assegurar que são utilizados 10µl de solução de ADN por reação. Demasiado ADN ou ADN insuficiente adicionado: concentração superior a 200 ng ou inferior a 20 ng pode originar falha da PCR. A contaminação do ADN pode dar origem a uma falha de amplificação esporádica ou generalizada.
Imagem do gel com manchas	ADN	Verificar a concentração e a pureza do ADN. A adição de demasiado ADN às reações PCR pode dar origem a imagens com manchas no gel. A causa pode ser pureza degradada ou baixa. Obter uma amostra fresca de ADN
Amplificação fraca.	Problema na concentração de ADN	Assegurar que a concentração de ADN não é demasiado baixa nem demasiado alta. Tentar atingir uma concentração de 50 - 100 ng de ADN por reação, em 10 µl.
	Problemas com o termociclador	Seguir as instruções de manutenção e de calibração do fabricante do termociclador. Verificar se os parâmetros PCR estão corretos, de acordo com as instruções de utilização.
	Erros no gel	Assegurar que foi adicionado o mesmo volume de reação a cada poço, entre 5 µl e 10 µl. Calibrar as pipetas conforme descrito nas instruções de utilização do fabricante. Utilizar solução de brometo de etídio nova.
Amplificação não específica	Problema na concentração de ADN	Assegurar que a concentração de ADN não é demasiado baixa nem demasiado alta. Tentar atingir uma concentração de 50 - 100 ng de ADN por reação, em 10 µl.
	Reações colocadas pela ordem incorreta	Verificar o alinhamento das faixas do gel e da PCR. Evitar o transbordamento físico dos poços adjacentes na eletroforese, não sobrecarregando e assegurando que o gel está consistente antes de remover os pentes.
	Novo alelo identificado	Alelos previamente não sequenciados podem estar

Problema	**Causa provável**	**Solução**
		presentes com um novo padrão de amplificação. Se estiver a utilizar folhas de interpretação antigas, descarregar uma atualização de alinhamento mais recente do sítio www.biofortuna.com. Se isto não acomodar o novo padrão, deve utilizar um kit Biofortuna diferente ou deve tentar identificar a sequência através da tipagem de sequências.
O padrão de amplificação não é interpretável	Artefacto incorretamente interpretado como uma banda específica	Consultar as Tabelas de Interpretação específicas para saber qual o tamanho correto da banda. Verificar se todas as amplificações específicas têm o tamanho correto ou se um artefacto (contaminação, primer dimer) foi incorretamente interpretado como uma amplificação.
	Reações colocadas pela ordem incorreta	Verificar o alinhamento das faixas do gel e da PCR.
	Falha individual da PCR	Verificar que todos os controlos positivos internos estão presentes. Voltar a interpretar sem reações em falta.
	Ausência de produtos amplificados de pequena dimensão	A eletroforese foi demasiado prolongada, os produtos amplificados de pequena dimensão saíram pela extremidade do gel ou através do brometo de etídio ou dispersaram-se, entrando no poço de gel anterior. Utilizar condições de eletroforese adequadas para o seu sistema de gel.
	Novo alelo identificado na amostra	Ocasionalmente podem ser descobertos ocasionalmente novos alelos, originando um padrão de amplificação que não corresponde a alelo(s) existente(s). Por favor contactar o seu distribuidor local.

14. Historial de revisão

Revisão: **Da versão 4 para a versão 5**

Data da revisão: **21 de janeiro de 2014**

Secção	Descrição da revisão
Secção 4: Conteúdo do kit	Adição de selantes de placas no kits
Secção 5: Reagentes e equipamentos não fornecidos	Especificações do termociclador de 96 poços atualizadas
	Condições de armazenamento atualizadas para 2-28°C
	Manuseamento de placas e tiras PCR não hidratadas
	Manuseamento de placas e tiras PCR hidratadas
Secção 8: Instruções de utilização	Diluição de ADM em água esterilizada para utilização em biologia molecular
	Adição de substâncias de interferência e atualização das orientações sobre pureza do ADN
	Medição $OD_{260/280}$ atualizada
	Adição da posição de pastilhas liofilizadas antes da adição da amostra
	Adição de condições de armazenamento de produto amplificado
	Adição de nota sobre os tempos de eletroforese de gel
Secção 9: Interpretação	Comentário sobre as notas específicas do lote
	O número de lote do kit deve corresponder ao número de lote na tabela de interpretação.
Secção 11: Dados clínicos	Adição de toda esta secção
Secção 14: Historial de revisão	Adição de toda esta secção

15. Legenda dos símbolos utilizados

Símbolo	Significado
Σ	Número de testes
EC REP	Representante CE
	Consultar as instruções de utilização
	Local de fabrico
IVD	Diagnóstico *in vitro*
	Prazo de validade
4°C – 28°C	Temperatura de conservação
LOT	Número de lote
	Distribuído por
GTIN	Número Global de Item Comercial

16. Fabricante

Biofortuna Ltd
1 Hawkshead Road
Croft Business Park
Bromborough, CH62 3RJ, UK
T: +44 (0) 151 334 0182
E: info@biofortuna.com
W: www.biofortuna.com

17. Traduções

FranÇaise:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россию:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

CE